

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Juni 2003 (05.06.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/045428 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/00, (74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Isenbruck Bösl Hörschler
C12N 5/10, A61P 35/00 Wichmann Huhn Possartstrasse 18, 81679 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/13531

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. November 2002 (29.11.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
60/334,491 30. November 2001 (30.11.2001) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, 82152 Planegg/Martin-
sried (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIELAND, John
[NL/DE]; Tellhöhe 18, 82131 Stockdorf (DE). BREI-
DENSTEIN, Claudia [DE/DE]; Eichendorffstrasse 28,
82140 Neu-Esting (DE). DINKEL, Adelheid [DE/DE];
Weinberger Strasse 48, 81241 München (DE). SAR-
TORIUS, Ute [DE/DE]; Jahnstrasse 9, 82152 Krailling (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/045428 A2

(54) Title: USE OF A TECHNICALLY MODIFIED CELL AS A VACCINE FOR TREATING TUMORAL DISEASE

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER TECHNISCH VERÄNDERTEN ZELLE ALS VAKZINE ZUR BEHANDLUNG EI-
NER TUMORERKRANKUNG

(57) Abstract: The invention relates to the use of a technically modified cell in the treatment of a tumoral disease. The technically
modified cell is not derived from the respective tumoral disease. The invention also relates to a medicament for the prophylaxis,
therapy and/or secondary prophylaxis of a tumoral disease, containing a technically modified cell.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer technisch veränderten Zelle zur Behandlung einer Tumorer-
krankung, wobei die technisch veränderte Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde, sowie ein Arzneimittel
zur Prophylaxe, Therapie und/oder sekundären Prophylaxe einer Tumorerkrankung enthaltend eine technisch veränderte Zelle.

**Verwendung einer technisch veränderten Zelle als Vakzine zur Behandlung
einer Tumorerkrankung**

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung einer technisch veränderten Zelle zur Behandlung einer Tumorerkrankung, wobei die technisch veränderte Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde, sowie ein Arzneimittel zur Prophylaxe, Therapie und/oder sekundären Prophylaxe einer Tumorerkrankung enthaltend eine technisch veränderte Zelle.

10

Die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zur Behandlung und Prävention von Tumoren gilt als ein vielversprechender Ansatz in der modernen Krebstherapie. Entsprechende Therapeutika werden allgemein als Vakzine/Tumorvakzine bezeichnet. Das Ziel einer Tumorkvakzine ist es, eine Immunantwort auszulösen, die in der Lage ist, Tumorzellen spezifisch im Körper zu zerstören. Hier-
15 bei kann es sich sowohl um Tumorzellen des Primärtumors als auch um Metastasen des Tumors handeln.

Einige dieser Therapien setzen einzelne oder mehrere Antigene ein, die als Proteine, Peptide oder DNA-Expressionsvektoren vorliegen. Derartige Vakzine können
20 beispielsweise als Gemische einzelner Tumorantigene, z.B. Tumorzelllysate vorliegen.

Eine Gruppe von Tumorkvakzinen bilden die zellulären Vakzinen, die allgemein
25 als autologe und allogene Vakzine verwendet werden können (Pardoll DM (1998) Nat Med 4(5 Suppl):525-31; Wolchock JD und Livingston PO (2001) Lancet Oncol 2 (4):205-11; Schadendorf D et al. (2000) Immunol Lett 15;74(1):67-74).

- Bei der autologen Vakzine werden Zellen vom patienteneigenen Tumor für die Herstellung der Vakzine verwendet. Dabei werden die Tumorzellen dem Körper entnommen, ggf. kultiviert und/oder modifiziert (gentechnisch oder biochemisch) und beispielsweise durch Bestrahlung proliferationsinkompetent gemacht, bevor
- 5 sie dem Patienten wieder verabreicht werden. Ziel ist es, dass Immunzellen, insbesondere cytotoxische T-Zellen und Helfer-T-Zellen, die verabreichten Zellen erkennen und so eine Immunantwort auslösen, die sich dann auch gegen den Tumor bzw. davon abgeleitete Metastasen richten kann.
- 10 Der Vorteil einer autologen Vakzine ist, dass die Übereinstimmung der Tumorantigene zwischen den Vakzine-Zellen und den zu bekämpfenden Tumorzellen möglichst groß ist. Der Nachteil ist, dass jeder Patient eine individuell produzierte Vakzine benötigt und die Zeit, die zur Produktion einer solchen Vakzine benötigt wird, unter Umständen lang ist. Da die Mortalität von Tumorpatienten in vielen
- 15 Tumorindikationen sehr hoch ist, ist eine lange Pause zwischen Diagnose/ Vorbereitung einer Therapie z.B. durch Entnahme von Zellen und einer anschließenden Vakzinierung nicht tolerierbar. Darüber hinaus ist eine individuelle Vakzine häufig aus Kostengründen nicht realisierbar.
- 20 Eine Alternative zur autologen Vakzinierung ist die sog. allogene Vakzinierung, d.h. die Immunisierung mit Zellen, die nicht vom selben Patienten, aber vom selben Tumortyp stammen. Bei dieser Vakzinierungsform unterscheiden sich die Vakzinezellen von den körpereigenen Tumorzellen des Patienten in zweierlei Hinsicht. Zum einen besitzen sie in der Regel nicht die identischen Transplantati-
- 25 onsantigene (MHC-Gene), die bei der Interaktion zwischen Vakzinezelle und T-Zellen eine Rolle spielen. Zum anderen unterscheiden sich die Vakzinezellen und die zu bekämpfenden Tumorzellen in dem Muster der exprimierten Tumorantigene, da Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs auch unterschiedliche Tumorantigene exprimieren. Da sich die durch die Vakzinierung erhoffte Immunreaktion
- 30 jedoch gegen bestimmte Tumorantigene richtet, ist eine möglichst große Überlap-

pung der Tumorantigenmuster bei allogenen Vakzinen für die Wirkung der Vakzine erwünscht bzw. notwendig.

Es konnte im Stand der Technik gezeigt werden, dass Tumorzellen desselben
5 Typs ähnliche Tumorantigenmuster exprimieren. Beispielsweise ist für das Melanom bekannt, dass Melanomzelllinien zumeist die Tumorantigene Tyrosinase, MART1/MelanA, Ny-ESO-1, MAGE3 und gp100 exprimieren (Peter I et al. (2001) Melanoma Research 11, 21-30). Diese Erkenntnis macht somit das Prinzip der allogenen Vakzinierung erst praktikabel, da eine große Wahrscheinlichkeit
10 besteht, dass ausreichend viele Tumorantigene zwischen Vakzinezelle und zu bekämpfender Tumorzelle identisch sind.

Weitere Kriterien für die Auswahl einer geeigneten Zelllinie für eine allogene Vakzine sind meist die Expressionsniveaus der Tumorantigene sowie die Expression weiterer Gene, z.B. der MHC Moleküle der Klassen 1 und 2, deren Haplotypen oder das Fehlen immuninhibitorischen Moleküle (wie IL10, TGF- β und Fas-Ligand).
15

Die Vorteile von allogenen Vakzinen sind, dass Patienten sofort bei gewünschtem Therapiebeginn geimpft werden können, da im Gegensatz zur autologen Vakzinierung die Vakzine nicht individuell hergestellt werden muss. Darüber hinaus kann potentiell jeder Patient geimpft werden, wohingegen bei einer autologen Vakzine eine Anzahl von Patienten nicht geimpft werden können, da die Erfolgsrate für die Kultivierung von Tumorzellen des Patienten zumeist weit unter 100 %
20 liegt und ein Teil der Patienten bis zur Bereitstellung der Vakzine nicht mehr therapierbar ist.

Dennoch gibt es auch bei Ansätzen mit allogener Vakzinierung die Schwierigkeit, dass für jeden Tumortyp eine spezifische allogene Zelllinie erforderlich ist, um eben wie oben erläutert eine möglichst große Überlappung der Tumorantigenmuster zu gewährleisten. Die Entwicklung einer spezifischen allogenen Vakzine ist
30

aus kommerziellen Gesichtspunkten bei verschiedenen Tumortypen mit eher niedrigen Patientenzahlen allerdings unattraktiv. Und auch für größere Indikationen wäre es insbesondere aus wirtschaftlichen Interessen vorteilhaft, nur eine Vakzine für so viele Patienten bzw. Tumorarten wie möglich zu besitzen.

5

Daher beruht die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe darin, eine Vakzine zu entwickeln, die für eine große Zahl verschiedener Tumorerkrankungen und eine große Zahl von Tumorpatienten geeignet ist.

10 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung einer technisch veränderten Zelle zur Herstellung einer Vakzine zur Behandlung oder Vorbeugung einer Tumorerkrankung, wobei die technisch veränderte Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet ist.

15 Unter einer technisch veränderten (dt. Übersetzung von *engineered*) Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Zelle verstanden, die aus einem Organismus isoliert wurde und an die Kultivierung in Zellkultur adaptiert wurde. Hierunter sind Maßnahmen der Subklonierung, Adaptation an bestimmte Wachstumsbedingungen wie Temperatur, Medien oder Medienzusätze wie Wachstumsfaktoren, Cytokine etc. zu verstehen. Technisch veränderte Zellen sind damit auch
20 Zellen, die mit löslichen Stoffen wie Wachstumsfaktoren oder Cytokine behandelt wurden und die daraufhin ein anderes Expressionsmuster bezüglich eines Proteins zeigen.

25 Ferner können derartige technisch veränderte Zellen gentechnisch verändert worden sein. Gentechnische Veränderungen umfassen das Einschleusen von genetischem Material in Form von DNA oder RNA, beispielsweise zur Expression von Transgenen.

Bevorzugt handelt es sich bei der technisch veränderten Zelle um eine eukaryontische Zelle, besonders bevorzugt um eine Säugierzelle, insbesondere um eine humane Zelle.

- 5 Insbesondere betrifft der Ausdruck „technisch veränderte Zelle“ aus Tumoren gewonnenen Zellen sowie von Tumorzellen abgeleitete Zelllinien.

Im Sinne der Erfindung bedeutet „abgeleitet“, dass ausgehend von einer einzelnen Tumorzelle bzw. einzelnen Tumorzellen eine oder mehrere Zelllinie(n) generiert
10 wird (werden). Derartige Verfahren sind im Stand der Technik beschrieben.

Im Sinne der Erfindung bedeutet „Tumorzelle“ sowohl eine direkt aus dem Tumor gewonnene Zelle als auch eine Zelle, die von der aus dem Tumor gewonnenen Zelle abgeleitet wurde, indem die aus dem Tumor gewonnene Zelle weiterkulti-
15 viert wurde. Verfahren zur Kultivierung von Zellen aus Tumoren sind im Stand der Technik bekannt.

Die erfindungsgemäße Verwendung technisch veränderter Zellen zur Herstellung einer Vakzine hat den Vorteil, dass die hergestellte Vakzine für die Behandlung
20 verschiedener Tumorerkrankungen geeignet ist. Dieser neuartige Vakzinierungsansatz ermöglicht es, die Entwicklungs- wie auch die Herstellungskosten von Vakzinen insbesondere bei selteneren Tumorindikationen dramatisch zu reduzieren und macht somit eine Entwicklung erst ökonomisch attraktiv.

25 Eine bevorzugte technisch veränderte Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mindestens ein, vorzugsweise mehrere Tumorantigene insbesondere endogen (also nicht über eine gentechnische Veränderung eingebracht) exprimiert.

30 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform exprimiert die Zelle embryonale Tumorantigene.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform exprimiert die Zelle mindestens 4, bevorzugt mindestens 7, insbesondere mindestens 10 Tumorantigene ausgewählt aus der Gruppe enthaltend Ny-ESO-1, CEA1, CEA2, CEA3, α -feto Protein, MAGE X2, BAGE, GAGE1, GAGE2, GAGE3, GAGE4, GAGE5, GAGE6, GAGE7, GAGE7a, GAGE8, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12, MAGE1, MAGE2, MAGE3, MAGE3b, MAGE4a, MAGE4b, MAGE5, MAGE5a, MAGE5b, MAGE6, MAGE7, MAGE8, MAGE9, PAGE1, PAGE4, CAMEL, PRAME, LAGE1, gp100 und p53.

Es wurde gezeigt, dass während der Tumorentwicklung die charakteristischen Gene, die im Endstadium des Tumors exprimiert sind, embryonale Tumorantigene wie Proteine der oben genannte Gruppe sind, insbesondere Proteine der MAGE-Familie, CEA, NY-ESO-1 und α -feto Protein. Die Auswahl einer Vakzinezelle hinsichtlich der Expression dieser embryonalen Tumorantigene lenkt somit die Immunantwort spezifisch auf Tumoren im Endstadium (bzw. weniger differenzierte Tumore) und/oder Metastasen. Im Gegensatz dazu sind zelluläre Vakzine, die aus stärker differenzierten Tumoren, also früheren Tumorstadien, hergestellt wurden, nur gegen solche stärker differenzierten Tumore gerichtet, was insbesondere zu einer „Fluchtmöglichkeit“ für Metastasen führt, da diese in der Regel kaum noch differenziert sind. Daher sind bevorzugte Tumorantigene einer zellulären Vakzine solche der MAGE-Familie, CEA, NY-ESO-1 und α -feto Protein.

Technisch veränderte Zellen gemäß der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise Tumorzellen, vor allem Hodentumorzellen (siehe z.B. Klade CS et al. (2002) Int J Cancer 10, 97: 217-24) oder embryonale Tumorzellen (Rossant J. and Papaioannou V.E. (1984) Cell Differ 15(2-4):155-61; Damjanov, I. (1990) Cancer Surv. 9(2): 303-19), sowie von derartigen Tumoren abgeleitete Zellen. Hodentumorzellen umfassen Tumorzellen von geminativen Hodentumoren, von einem Seminom, von einem embryonalen Karzinom oder einem entdifferenzierten Te-

- 7 -

ratom oder Teratokarzinom, und Chorionkarzinom. Insbesondere bevorzugt sind Zellen abstammend von einem embryonalen Karzinom oder einem Teratokarzinom.

- 5 Damit betrifft die Erfindung insbesondere die Verwendung einer Hodentumorzelle, einer embryonalen Tumorzelle oder von Zellen aus von Hodentumorzellen oder embryonalen Tumorzellen abgeleiteten Zelllinien zur Herstellung einer Vakzine zur Vorbeugung oder Behandlung einer Tumorerkrankung, wobei die verwendete Zelle und die Tumorerkrankung nicht vom gleichen Tumortyp stammen.

10

Überraschenderweise sind Hodentumorzellen oder embryonale Tumorzellen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer großen Vielfalt verschiedener Tumortypen ganz besonders geeignet, da sie in der Lage sind, eine Vielzahl von verschiedenen T-Zellen zu aktivieren. Diese besondere Eignung liegt insbesondere daran, dass diese Tumorzellen eine große Anzahl an embryonalen Antigenen exprimierten, die von differenzierten Zellen nicht mehr exprimiert werden. Diese Antigene werden durch diese Zellen präsentiert und können in einer Vakzinierungssituation eine spezifische Immunreaktion auslösen, die gegen sämtliche Zellen gerichtet ist, die diese embryonalen (Tumor-)Antigene exprimieren.

20

Da - wie oben beschrieben - Tumoren bzw. Metastasen während ihrer Tumorentwicklung eine zunehmende Anzahl embryonaler (Tumor-)Antigene exprimieren, ist die Wahrscheinlichkeit besonders groß, dass eine gewisse Übereinstimmung der exprimierten Antigene zwischen Vakzinazelle und Tumorzelle vorliegt und somit eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorzelle ausgelöst wird.

25

Basis dieses Mechanismus ist, dass die negative Selektion der spezifischen T-Zellen gegen die "Selbst-Antigene" erst stattfindet, nachdem die Expression der embryonalen Antigene abgeschaltet wurde (Janeway C. et al. (1999) Immunobiology: the immune system in health and disease, 4th ed., Current Biology Publications, New York, insbesondere Seiten 227, 233, 241-257). Wäre dies nicht der

30

Fall, so wäre der Körper prinzipiell nicht in der Lage, eine Immunantwort gegen ein embryonales Antigen zu generieren.

Darüber hinaus können immortale Zellen, die vorzugsweise eine große Zahl von Tumorantigenen exprimieren, verwendet werden. Methoden zur Immortalisierung solcher Zellen sind im Stand der Technik z.B. aus WO 97/00946 oder Katakura Y. et al. (1998, Methods Cell Biol. 57:69-91) bekannt. Vorzugsweise können Stammzellen, besonders embryonale Stammzellen, verwendet werden.

Erfindungsgemäß ist es möglich, die Immunogenität der Vakzinezellen dadurch zu verbessern, dass sie Cytokine, Chemokine und/oder kostimulatorische Moleküle exprimieren.

Bevorzugte technisch veränderte Zellen sind solche, die durch genetische Modifikation verändert wurden. Solch eine genetische Modifikation kann beispielsweise zu einer Immortalisierung der Zellen oder dem Ausschalten bzw. Herunterregulieren der Expression bestimmter unerwünschter Gene wie z.B. immunsuppressiver Moleküle (wie IL10, TGF- β und Fas-Ligand) führen. Ferner können die Zellen so modifiziert werden, dass sie ein oder mehrere Moleküle aus der Gruppe enthaltend Cytokine, Chemokine und/oder kostimulatorische Moleküle exprimieren.

Methoden zum Ausschalten bzw. Herunterregulieren der Expression von Genen sind dem Fachmann bekannt. Als Beispiel sind hier Ribozyme (Usman N. und Blitt L.M. (2000) J. Clinical Investigation 106(10): 1197-1202), antisense RNAs (Branch A.D. (1996) Hepatology 24: 1517-29) oder die RNAi-Technologie (Tuschl T. et al. (1999) Genes & Development 13: 3191-3197, O'Neil N.J. et al. (2001) Am. J. Pharmacogenomics 1(1): 54-53) zu nennen.

Die Cytokine und/oder Chemokine können ausgewählt werden aus der Gruppe enthaltend GM-CSF, G-CSF, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10,

IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IFN α , IFN β , IFN γ , Flt3 L, Flt3, TNF α , RANTES, MIP1 α , MIP1 β , MIP1 γ , MIP1 δ , MIP2, MIP2 α , MIP2 β , MIP3 α , MIP3 β , MIP4, MIP5, MCP1, MCP1 β , MCP2, MCP3, MCP4, MCP5, MCP6, 6cykine, Dcck1 und DCDF. Bevorzugte Cytokine/Chemokine sind GM-CSF, RANTES und/oder MIP1 α .

Kostimulatorische Moleküle können ausgewählt werden aus der Gruppe enthaltend B7.1, B7.2, CD40, Light, Ox40, 4.1.BB, Icos L, SLAM, ICAM 1, LFA-3, B7.3, CD70, HSA, CD84, CD7, B7 RP-1 L, MAdCAM-1, VCAM-1, CS-1, CD82, CD30, CD120a, CD120b, TNFR-RP, CD40L, Ox40L und Rae-1, wobei B7.1 und B7.2 bevorzugte kostimulatorische Moleküle sind.

Eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung ist, dass solche exprimierten Cytokine, Chemokine oder kostimulatorischen Moleküle mutiert sind. Solche Mutationen beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, Punktmutationen, Deletionen, Insertionen oder Fusionen mit anderen Peptiden oder Proteinen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die technisch veränderte Zelle auch ein Fusionsprotein aus den oben genannten Cytokinen, Chemokinen oder kostimulatorischen Molekülen exprimieren. Ferner ist erfindungsgemäß eingeschlossen, dass die Zelle funktionelle Varianten der oben genannten Polypeptide exprimiert, wobei sich funktionelle Varianten dadurch auszeichnen, dass sie im Wesentlichen die gleiche biologische Aktivität wie die genannten Polypeptide aufweisen. Im Stand der Technik sind zu den jeweiligen Polypeptiden Tests bekannt, mit deren Hilfe die Polypeptide nachgewiesen bzw. deren jeweilige Aktivität gemessen werden kann.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform exprimiert die technisch veränderte Zelle B7.2 und GM-CSF, da die Kombination dieser beiden Moleküle zu einer überraschend hohen Wirksamkeit der Vakzine führt.

Verfahren zur genetischen Veränderung von Zellen sind im Stand der Technik gut bekannt. Bevorzugte Ausführungsformen sind Zellen, die mit mindestens einer Nukleinsäure stabil transfiziert sind, die für mindestens ein Cytokin, Chemokin oder kostimulatorisches Molekül kodiert. Das bedeutet, dass die für ein solches Cytokin, Chemokin oder kostimulatorisches Molekül kodierende Nukleinsäure in das Genom der Zelle integriert ist und daher während des S-Phasen-Übergangs der Zelle dupliziert und auf die Tochterzellen im Rahmen der normalen Chromatidentrennung weitergegeben wird. Darüber hinaus können stabil transfizierte Zellen durch episomale Nukleinsäuren erhalten werden, die einer von der Zellreplikationmaschinerie unabhängigen Replikation unterliegen. Beispiele für solche autonomen Replikationssysteme sind z.B. virale Replikationssysteme enthaltend ein Initiatorprotein wie SV40 large T-Antigen oder EBNA1 und einen Replikationsstartpunkt wie SV40ori oder EBV oriP.

Eine andere Möglichkeit, um die Expression solcher Cytokine, Chemokine oder kostimulatorischen Moleküle zu erhalten, ist ein episomal replizierendes Plasmid, das einen selektierbaren Marker enthält, und die Selektion auf diesen Marker.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die Expression solcher Cytokine, Chemokine oder kostimulatorischen Moleküle durch einen konstitutiven Promotor, beispielsweise den CMV Promotor (Vincent et al (1990) Vaccine 90, 353, den SV40-Promotor (Samulski et al (1989) J Virol 63, 3822) oder den LTR-Promotor von Retroviren (Lipkowski et al (1988) Mol Cell Biol 8, 3988), durch einen induzierbaren Promotor, beispielsweise den tet-Promotor, und/oder durch einen gewebespezifischen Promotor, beispielsweise den Elongation Factor Promotor, den Ig Promotor oder den IL2/NFAT Promotor, kontrolliert.

Zur Transfektion der technisch veränderten Zellen kann ein Standardplasmid verwendet werden, das eine kodierende Nukleinsäure, vorzugsweise eine DNA, und zumindest ein regulatorisches Element wie einen Promotor oder einen Enhancer enthält. Die Transfektion kann beispielsweise durch Calciumphosphat-

Transfektion, Elektroporation oder liposomale Transfektion durchgeführt werden. Darüber hinaus können zur Transfektion der Zellen virale Vektoren wie beispielsweise das Herpes Simplex Virus (HSV), Amplicon, adenoassoziiertes Virus (AAV), ein Adenovirus oder Retrovirus verwendet werden. Beispielsweise offen-
5 bart US 6,171,597, das hiermit als Referenz eingeschlossen wird, geeignete AAV-Vektoren zur Herstellung von Zellen, die mindestens ein Cytokin exprimieren.

AAV ist zur Transfektion der Zellen deshalb bevorzugt, da sich dieses Virus besonders gut für die Integration von Transgenen in das Zellgenom eignet. Bevor-
10 zugt liegt/liegen das/die Transgene integriert in die AAV-S1 Akzeptorstelle vor, insbesondere in Form von Konkatemeren. Eine Integration von Konkatemeren des/der Transgene hat den Vorteil, dass eine derartige Vervielfachung der Gene zu einer stärkeren Expression der Transgene führt. Sofern sich die technisch veränderte Zelle nicht durch einen natürlich vorkommenden AAV-Serotyp, insbesonde-
15 re AAV-2, infizieren lässt, so können Kapsidmutanten hergestellt werden, mit Hilfe derer eine Infektion der Zelle durchgeführt werden kann (siehe WO 99/67393).

Bevorzugte Tumorkrankheiten, die behandelt werden können, sind Melanom, Ei-
20 erstockkrebs, Brustkrebs, Kolonkarzinom, Leukämie, Lymphom, Nierenkarzinom, Lungenkarzinom, Prostatakarzinom, zervikales Karzinom, Neuroblastom, Osteosarkom, Thymom, Hepatom, Kehlkopfkrebs, Analkrebs, Magenkrebs, Schilddrüsenkrebs, Seminom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Mesotheliom und/oder Gehirntumor.

25 Eine solche Behandlung kann mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie oder einer chirurgischen Entfernung des Tumors oder einer Metastase kombiniert werden.

30 Solche Zellen können als Arzneimittel verwendet werden, das als prophylaktische Vakzinierung, als eine Therapie bei einem vorhandenen Tumor oder als eine se-

kundäre Prophylaxe angewandt wird, wobei der primäre Tumor und/oder eine oder mehrere Metastasen durch einen chirurgischen Eingriff, Chemotherapie oder Bestrahlung entfernt wurden und das Risiko für das Wiederauftreten eines Tumors reduziert werden soll.

5

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäß verwendete Zelle proliferationsinkompetent, beispielsweise durch Bestrahlung oder chemische Inaktivierung. Es ist beispielsweise bekannt, dass Tumorzellen durch eine gamma-Bestrahlung mit 25-100 Gy proliferationsinkompetent werden (siehe z.B. WP 97/32988). Für eine chemische Inaktivierung kann beispielsweise die Zugabe von 40 µg/ml Mitomycin verwendet werden. Unter „proliferationsinkompetent“ wird erfindungsgemäß verstanden, dass die Tumorzelle nicht mehr in der Lage ist, zu proliferieren.

15 Die durch die erfindungsgemäße Verwendung hergestellte Vakzine dient dazu, im Patienten eine Immunantwort auszulösen. In manchen Fällen ist es dazu nicht erforderlich, dass das Arzneimittel zusätzlich ein Adjuvans enthält. Dabei ist im Rahmen der Erfindung ein Adjuvans als eine Verbindung definiert, welche das Auslösen einer Immunantwort verstärken kann.

20

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Arzneimittel zusätzlich ein Adjuvans, das ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend AlOH, CpG, doppelsträngige RNA; oxidiertes oder reduziertes Glutathion, BCG, Salmonella, komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplettes Freundsches Adjuvans, Cytokine oder Chemokine wie z.B. lösliche Proteine, Iscome oder spezifische Antikörper für CD40, toll-artige Rezeptoren (stimulierend) oder CTLA4 (blockierend).

Vorzugsweise werden solche Adjuvantien verwendet, die als Toll-Like-Receptor-Agonisten wirken. Dies sind z.B. CpG Oligonukleotide. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide, die mindestens ein CpG Motiv enthalten (siehe z.B. Wagner H (2001) Immunity 14, 499-502). Ferner fallen unter diese Definition Lipopoly-

30

- 13 -

saccharide (LPS) bzw. Komponenten davon, wie z.B. der Lipid A-Anteil oder der Poly- oder Oligosaccharidanteil. LPS sind die hauptsächlichen Außenmembrankomponenten von nahezu allen Gram-negativen Bakterien und sind dafür bekannt, als starke Stimulatoren des Immunsystems zu wirken. LPS bestehen aus einer

5 Poly- oder Oligosaccharidregion, die durch das Lipid A in der äußeren Bakterienmembran verankert sind. Die spezifische, zelluläre Erkennung des LPS/Lipid A wird durch die gemeinsame extrazelluläre Interaktion des LPS binding protein, dem membrangebundenen oder der löslichen Form von CD14 und dem Toll-like receptor 4*MD2-Komplex vermittelt. Dies führt zu einer raschen Aktivierung

10 eines intrazellulären Signalnetzwerks, das zu der Signaltransduktionskaskade homolog zu dem von IL-1 und IL-8 führt (Alexander C and Rietschel ET (2001) J Endotoxin Res 7, 3, 167-202).

Ferner umfasst die Erfindung die Verwendung eines Adjuvans, das von Bacillus

15 Calmette-Guerin cell wall skeleton (BCG-CWS) abgeleitet ist. Von BCG-CWS ist bekannt, dass es ein Ligand der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 ist und die Differenzierung von Immunzellen auslösen kann (Matsumoto M et al (2001) Int Immunopharmacol 1, 8, 1559-69).

20 Ferner umfasst die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Superantigen als Adjuvans. Superantigene sind Antigene, die direkt an T-Zellrezeptoren und MHC-Moleküle binden und eine direkte Aktivierung der T-Zellen bewirken. Von diesen ist bekannt, dass diese auch eine adjuvante Wirkung haben können (siehe z.B. Okamoto S et al (2001) Infect. Immun. 69,11, 6633-42). Bekannte Superantigene sind z.B. *Staphylococcus aureus* Enterotoxine A, B, C, D und E (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), *Staphylococcal aureus* toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), *Staphylococcal exfoliating toxin* oder *Streptococcal pyrogenic exotoxins*.

30 Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung von Agentien, die die Signaltransduktionskaskade von CTLA-4 inhibieren. Dabei kann es

sich um Antikörper oder Antikörperfragmente handeln, die spezifisch an die extrazelluläre Domäne von CTLA-4 binden und dessen Signaltransduktionskaskade inhibieren. Die Generierung bzw. das Screening derartiger Antikörper bzw. Antikörperfragmente ist dem Fachmann bekannt (siehe z.B. WO 0032231). Weitere
5 Agenzien, die geeignet sind, CTLA-4 zu binden und dessen Signaling zu inhibieren, sind kleine organische Moleküle, Peptidanaloga oder lösliche T-Zellrezeptoren (siehe WO 97/20574).

Die Herstellung von Vakzinen enthaltend erfindungsgemäße technisch veränderte
10 Zellen bzw. deren Einsatz bei der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt in üblicher Weise anhand geläufiger pharmazeutisch-technologischer Verfahren. Dazu werden die technisch veränderten Zellen zusammen mit geeigneten, pharmazeutisch annehmbaren Hilfs- und Trägerstoffen zu den für die verschiedenen Indikationen und Applikationsorte geeigneten Arzneiformen verarbeitet.

15 Bevorzugte Hilfs- und Trägerstoffe sind Additive, Stabilisatoren und/oder Bindemittel. Hierzu zählen insbesondere Proteine, Peptide und Aminosäuren wie z.B. humane Plasmaproteine, insbesondere Albumin, aber auch rekombinantes Serumalbumin, des Weiteren Proteaseinhibitoren wie z.B. Aprotinin, ϵ -Aminocarbonsäure, Pepstatin A, EDTA oder EGTA. Ferner gehören zu dieser Gruppe
20 Salze wie insbesondere Natriumchlorid, Natriumoctanoat, Natriumcaprylat und Natriumacetyltryptophanat. Weitere geeignete Zusätze sind Ethanol oder DMSO.

Zur Einstellung des pH-Wertes können beispielsweise osmotisch wirksame Säuren und Laugen, z.B. Salzsäure, Zitronensäure, Natronlauge, Kalilauge, Natriumhydrogencarbonat, ferner Puffersysteme, wie z.B. Citrat, Phosphat, Tris-Puffer, HEPES-Puffer, MOPS-Puffer oder Triethanolamin verwendet werden.
25

Eine bevorzugte Formulierung einer erfindungsgemäßen Vakzine enthält ca. 10^6
30 bis 5×10^8 Zellen in einem Volumen von 0,1 bis 10 ml, insbesondere 0,5 bis 5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung mit Hilfs- und Trägerstoffen, z.B. einer

- 15 -

Infusionslösung. Geeignete Infusionslösungen sind z.B. „Human Albumin 20% Immuno“ von Baxter, Unterschleißheim (1000 ml Infusionslösung enthalten: 200 g Plasmaproteine vom Menschen mit mind. 95% Albumin, 3,0 g Natriumchlorid, 2,7 g Natriumoctanoat, 4,3 g Natriumacetyltryptophanat) oder „Human-Albumin 5 20 % Behring“ von Aventis Behring, Marburg (1000 ml Infusionslösung enthalten: 200g Plasmaproteine vom Menschen mit mind. 96% Albumin, 125 mmol Natrium-Ionen, max. 2 mmol Kalium-Ionen, max. 2 mmol Calcium-Ionen, max. 100 mmol Chlorid-Ionen, 16 mmol Octanoat-Ionen, 16 mmol N¹-Acetyl-D-/L-Tryptophanat).

10 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Arzneimittel zur Prophylaxe, Therapie und/oder sekundären Prophylaxe einer Tumorerkrankung enthaltend eine wie oben definierte technisch veränderte Zelle.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Arzneimittel zusätzlich 15 mindestens ein Adjuvans ausgewählt aus der Gruppe enthaltend CpG, oxidiertes oder reduziertes Glutathion, BCG, Salmonella, komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplettes Freundsches Adjuvans, Cytokine oder Chemokine, z.B. lösliche Proteine, Iscome oder spezifische Antikörper gegen CD40, Toll-artige Rezeptoren (aktivierend) oder CTLA4 (blockierend).

20 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Arzneimittel dazu geeignet, subkutan, intrakutan, intravenös oder intranodal verabreicht zu werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Patient ein Säu- 25 getier, vorzugsweise ein Mensch.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeu- gung einer Tumorerkrankung, bei dem einem Patienten eine wirksame Menge einer technisch veränderten Zelle verabreicht wird, wobei die technisch veränderte 30 Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde.

Die oben aufgeführten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verwendung gelten auch für das erfindungsgemäße Verfahren.

Wie oben im Detail ausgeführt hat es sich im Rahmen der Erfindung überraschen-
5 derweise herausgestellt, dass Zellen, die embryonale Tumorantigene exprimieren, besonders für die Behandlung von Tumoren im Endstadium geeignet sind.

Daher betrifft die Erfindung auch die Verwendung einer mindestens ein embryo-
nales Tumorantigen exprimierenden Zelle zur Herstellung einer Vakzine zur Be-
10 handlung von Tumorerkrankungen im Endstadium, wobei die Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform exprimiert die Zelle mindestens 3
embryonale Tumorantigene.

15 Die oben aufgeführten Ausführungsformen der anderen erfindungsgemäßen Verwendung gelten auch für diese erfindungsgemäße Verwendung.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu be-
20 schränken.

Beispiel 1**Expression von Tumorantigenen durch embryonale Tumorzelllinien**

Um zu untersuchen, ob prinzipiell eine Hodentumor- oder embryonale Tumorzelllinie dazu geeignet ist, wurde untersucht, ob diese tatsächlich mehr Tumorantigene exprimiert als Tumorzellen von herkömmlichen soliden Tumoren. Folgende Zelllinien wurden untersucht:

F9	Embryokarzinom (Haplotyp: H2-b) (ATCC CRL-1720)
10 B16F10	Melanom (C57/Bl6, H2-b) (ATCC CRL-6475)
CT26	Kolonkarzinom (Balb/c, H2-d) (ATCC CRC 2638)
K1735	Melanom (C3H, H2-k) (Staroselsky AH et al. (1991) Cancer Res. 51, 6292-98)
15 Renca	Nierenkarzinom (Balb/c, H2-d) (Murphy, GP and WJ Hrushesky (1973) J Natl Cancer Inst 50:1013-25).

Die Analyse hinsichtlich der Expression bekannter Tumorantigene erfolgte mittels der Array-Technologie von Affymetrix (Santa Clara, CA, USA). Hierzu wurden 50 µg Gesamt-RNA der oben genannten Zellen mittels RNeasy Mini Säulen (Qiagen, Hilden) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. 5 µg der gereinigten Gesamt-RNA wurden eingesetzt, um den ersten und zweiten Strang der cDNA zu synthetisieren. Anschließend wurde diese cDNA eingesetzt, um biotinylierte cRNA-Proben herzustellen, wie dies vom Hersteller Affymetrix empfohlen ist. 15 µg der fragmentierten, markierten cRNA wurde zur Hybridisierung von Gene Chip® Arrays verwendet, die das Mausgenom repräsentieren (U74A). Anschließend wurden die Hybridisierungssignale mit einem Biotin-markierten anti-Streptavidin-Antikörper und durch einen weiteren SAPE-Färbungsschritt verstärkt. Die Daten wurden mittels Microarray Suite und Data Mining Tool Software (Affymetrix) analysiert. Der verwendete Chip U74A repräsentiert

12.588 Transkripte des murinen Genoms, die sich aus ca. 6000 funktionell charakterisierten Sequenzen der Maus UniGene Datenbank (Build 74) und weiteren ca. 6000 EST Klustern zusammensetzen.

- 5 Mittels dieser Technologie wurden die Zelllinien F9, B16F10, CT26, K1735 und Renca verglichen. Hinsichtlich der exprimierten, bekannten Tumorantigene konnte gezeigt werden, dass F9-Zellen nahezu alle bekannten Tumorantigene, auf die in dem Array getestet wurde, exprimieren, hingegen die Zellen B16F10, CT26, K1735 und Renca eine Reihe von wichtigen Tumorantigen nicht exprimieren.
- 10

Tumorantigene, die von allen 5 getesteten Zelllinien exprimiert werden, sind:

Cluster Incl	Name	No.
J04509:	Jun proto-oncogene related gene d1	/cds=(121,1146) /gb=J04509 /gi=198486 /ug=Mm.1175 /len=1147
D63707:	Mouse mRNA for hepatoma derived growth factor (HDGF), complete cds	/cds=(61,774) /gb=D63707 /gi=945418 /ug=Mm.1141 /len=1563
U35142:	Mus musculus retinoblastoma-binding protein (mRbAp46) mRNA, complete cds	/cds=(259,1536) /gb=U35142 /gi=1016276 /ug=Mm.1603 /len=1748
X79233:	Ewing sarcoma homolog	/cds=(56,2023) /gb=X79233 /gi=488512 /ug=Mm.22691 /len=2188
X89650:	RAB7, member RAS oncogene family	/cds=(156,779) /gb=X89650 /gi=1050550 /ug=Mm.4268 /len=2089
M61909:	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene homolog A	/cds=(60,1709) /gb=M61909 /gi=200025 /ug=Mm.28170 /len=2424
D63707:	Mouse mRNA for hepatoma derived growth factor (HDGF), complete cds	/cds=(61,774) /gb=D63707 /gi=945418 /ug=Mm.1141 /len=1563
AF011644:	Mus musculus oral tumor suppressor homolog (Doc-1) mRNA, partial cds	/cds=(0,330) /gb=AF011644 /gi=2305225

		/ug=Mm.35847 /len=981
U35141:	Mus musculus retinoblastoma-binding protein (mRbAp48) mRNA, complete cds	/cds=(107,1492) /gb=U35141 /gi=1016274 /ug=Mm.12145 /len=1961
X51528:	Tissue specific transplantation antigen P198-7	/cds=(18,629) /gb=X51528 /gi=55049 /ug=Mm.13020 /len=654
Y13361:	RAB7, member RAS oncogene family, pseudogene 1	/cds=(0,623) /gb=Y13361 /gi=2168154 /ug=Mm.87807 /len=624
Z50013:	Harvey rat sarcoma virus oncogene	/cds=(0,569) /gb=Z50013 /gi=895862 /ug=Mm.6793 /len=570 /NOTE=replacement for probe set(s) 101005_at on MG-U74A
AB021961:	Mus musculus mutant p53 mRNA, complete cds	/cds=(100,1272) /gb=AB021961 /gi=5421849 /ug=Mm.222 /len=1429
AF012923:	Mus musculus p53-inducible zinc finger protein (Wig-1) mRNA, complete cds	/cds=(173,1045) /gb=AF012923 /gi=2804680 /ug=Mm.35705 /len=7661
U28789:	Mus musculus p53-associated cellular protein PACT mRNA, partial cds	/cds=(0,4764) /gb=U28789 /gi=1546778 /ug=Mm.4480 /len=5191
Z22819:	RAB24, member RAS oncogene family	/cds=(0,611) /gb=Z22819 /gi=438163 /ug=Mm.18800 /len=660
AI850893:	UI-M-BH0-ajt-g-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3' end	/clone=UI-M-BH0-ajt-g-07-0-UI /clone_end=3 /gb=AI850893 /gi=5494799 /ug=Mm.29105 /len=375
M21019:	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R	/cds=(11,667) /gb=M21019 /gi=200676 /ug=Mm.257 /len=949
X65687:	Thymoma viral proto-oncogene	/cds=(283,1725) /gb=X65687 /gi=287806 /ug=Mm.6645 /len=2626
AB021961:	Mus musculus mutant p53 mRNA, complete cds	/cds=(100,1272) /gb=AB021961 /gi=5421849 /ug=Mm.222 /len=1429